

【要約】

修士課程優秀論文

TGF β 1を介した血管新生における脂質リン酸化酵素
PI3キナーゼクラスII α アイソフォーム (PI3K-C2 α) の役割Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase class II α isoform (PI3K-C2 α)
in TGF β 1-induced angiogenesis金沢大学大学院医学系研究科血管分子生理学
(生理学第一)

安 藝 翔

はじめに

脂質リン酸化酵素ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI3K) は哺乳類において、3つのクラス (I, II及びIII), 8つのアイソフォームが存在し、その生成物であるPI(3)P, PI(3,4)P₂及びPI(3,4,5)P₃を介して多岐に渡る生理作用を発揮する。このうち、クラスI PI3Kは、細胞増殖、細胞生存、細胞運動や糖輸送の調節に関与することが解明されている。また、クラスIII PI3Kは、細胞内小胞輸送の調節に関与している。一方これとは対照的に、クラスII型PI3K-C2 α (C2 α) の生理機能はほとんど不明であった (表1)。当研究室では、C2 α が血管平滑筋においてCa²⁺による低分子量GタンパクRhoの活性化を介して血管収縮に重要な役割をはたすことを解明した²⁾³⁾。

TGF β 1はTGF β 1受容体を介してSmad2/3をリン酸化する。リン酸化されたSmad2/3は、co-Smad (Smad4) と結合し、核内へ移行し、転写因子として機能してプラスミノーゲンアクティベーターインヒビター-1 (PAI-1)、フィブロネクチンなど様々な遺伝子の転写を活性化することにより血管成熟に関与することが知られている。TGF β 1は*in vivo*で血管新生作用を示すが、血管内皮細胞に及ぼす直接作用は依然不明な点が多い⁴⁾。

本研究では、C2 α の血管新生における役割とその分子機構を明らかにすることを目的とし、RNA干渉法を用いてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) におけるC2 α タンパクの発現を抑制し、TGF β 1の作用がどのように影響されるかを検討した。さらに、C2 α ヘテロKOマウスと野生型マウスの皮下に血管新生の基質となるマトリゲルを植え込み、TGF β 1により*in vivo*で誘導される血管新生にC2 α がどのように影響するかを検討した。

結 果

HUVECsにおいてC2 α ノックダウンはTGF β 1刺激によるSmadリン酸化を抑制する

血管内皮細胞におけるC2 α の役割を検討するために、RNA干渉法を用いてHUVECsのC2 α 発現を抑制することにより、主要な血管新生因子であるVEGF, Ang-1, TGF β 1のシグナル伝達がどのように影響を受けるかを検討した。sc-siRNA導入細胞 (コントロール細胞) とC2 α -siRNA導入細胞 (C2 α ノックダウン細胞) の両者を、TGF β 1あるいはVEGFで刺激し、VEGFに関してはERKのリン酸化を、TGF β 1に関してはSmad3のリン酸化を評価した。興味深いことに、TGF β 1によるSmad3のリン酸化はコントロール細胞と比較してC2 α ノックダウン細胞で、顕著に低下していた (図1)。同様に、TGF β 1によるSmad2のリン酸化もC2 α ノックダウン細胞で低下していた。しかし、VEGFによるERKのリン酸化はコントロール細胞とC2 α ノックダウン細胞の間で差異は認められなかった。

VEGFによるERKのリン酸化はコントロール細胞とC2 α ノックダウン細胞の間で差異は認められなかった。

C2 α ノックダウンはTGF β 1刺激によるSmad2/3の核移行を抑制する

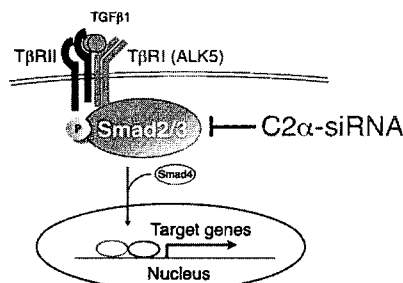
蛍光免疫細胞染色により、TGF β 1により誘導されるSmad2/3のリン酸化及び、核への移行を評価した。抗リン酸化Smad2抗体を用いた蛍光免疫細胞染色により、TGF β 1刺激によるHUVECs細胞内のリン酸化Smad2の増加が観察された。C2 α ノックダウンHUVECsにおいて細胞内のリン酸化Smad2は、コントロール細胞と比較して著しく低下していた。また、抗Smad2/3抗体を用いた蛍光免疫細胞染色により、TGF β 1刺激がSmad2/3の核移行を誘導することが観察された。C2 α ノックダウンHUVECsにおいてTGF β 1刺激により誘導されるSmad2/3の核移行は、コントロール細胞と比較して有意に低下していた。

C2 α ヘテロKOマウスにおいてTGF β 1によるマトリゲルプラグ内血管新生は著しく抑制される

TGF β 1含有マトリゲルおよびコントロールであるPBS含有マトリゲルをC2 α ヘテロKOマウスおよび野生型マウスの皮下に移植した。摘出したマトリゲル内に形成され

表1. PI3キナーゼ (PI3K) ファミリーの分類

PI3キナーゼ (PI3K)ファミリー				
クラス	触媒サブユニット	発現部位	KOマウス表現型	細胞レベルでの機能
Ia	p110 α	広範囲	胎生致死 (E10)	増殖、分化、生存
	p110 β	広範囲	胎生致死 (E7)	遊走、分化、生存
	p110 δ	血液系細胞、胸腺	白血球機能異常	遊走
Ib	p110 γ	血液系細胞、胸腺、心臓	白血球機能異常	遊走
II	C2 α	広範囲 血管、上皮に高発現	?	血管平滑筋収縮 細胞内小胞輸送?
	C2 β	広範囲	正常	遊走?
	C2 γ	肝臓、甲状腺	—	?
III	Vps34	広範囲	—	細胞内小胞輸送

図1. TGF β 1-Smad2/3シグナル伝達系

た微小血管を、内皮細胞マーカー抗vWF抗体を用いた免疫組織化学染色により検出したところ、野生型マウスでは、TGF β 1はマトリゲル内の微小血管数が著しく増加していた。対照的に、C2 α ヘテロKOマウスではTGF β 1により誘導される微小血管形成は野生型マウスと比較して減少していた。次に、血管平滑筋を染色する抗 α SMA抗体と内皮を染色する抗vWF抗体による二重免疫蛍光染色によりマトリゲル内血管の成熟度を評価した。野生型マウスでは、TGF β 1はコントロールと比較するとマトリゲル内の微小血管壁への血管平滑筋の集積を促進した。これとは対照的に、C2 α ヘテロKOマウスでは、TGF β 1は微小血管壁への血管平滑筋の集積を促進しなかった。

C2 α ヘテロKOマウスと野生型マウスにおけるマトリゲル内の微小血管形成の差異がTGF β 1に特異的な反応であるかどうかを検討する為に、強力な別の血管新生因子VEGFにより誘導されるマトリゲル内血管新生を、両マウスの間で比較検討した。野生型マウスではVEGFはコントロールに比較してマトリゲル内の微小血管数を増加させた。抗vWF抗体染色により、VEGFはC2 α ヘテロKOマウスでも野生型マウスと同程度に微小血管数を増加させることが示された。また、抗 α SMA抗体染色により、血管壁の平滑筋の発達は、C2 α ヘテロKOマウスでは野生型マウスと同程度にVEGFにより促進された。このことから、VEGFによる血管新生/成熟はTGF β 1とは異なりC2 α のヘテロ欠損により影響を受けないことが明らかとなった。

考 察

TGF β 1は血管壁細胞(平滑筋/周皮細胞)に作用して分化や細胞外基質産生を促進し、血管成熟にかかわる因子である。壁細胞の他にTGF β 1は内皮細胞に対しても作用をおよぼすことが示唆されているが、TGF β 1の内皮作用には不明の点が多い⁷⁾。これまでの研究成果より、血管内皮細胞に対するTGF β 1作用には、Smadシグナル伝達系が重要な役割をはたすことが示唆されていた。本研究の結果により、C2 α が内皮細胞におけるTGF β 1によるSmad活性化に必須であることが初めて明らかとなった。

本研究では、TGF β 1による*in vivo*血管新生におけるC2 α の役割を解明する目的で、C2 α ヘテロKOマウスと野生型マウスでマトリゲルプラグアッセイを行い、血管新生を比較した。まず第一に、TGF β 1は野生型マウスにおいてマトリゲル内血管新生を著しく促進することを確認し、TGF β 1による*in vivo*での血管新生の誘導系を確立することができた。C2 α ヘテロKOマウスと野生型マウスの比較では、TGF β 1によるマトリゲル内血管新生はC2 α ヘテロKOマウスで著明に抑制され、C2 α はTGF β 1により誘導される*in vivo*血管新生に必須であることが明らかとなった。第二に、C2 α ヘテロKOマウスでは、マトリゲル内のvWF抗体陽性の微小血管数の減少と α SMA抗体陽性の血管平滑筋の発達不良の両所見が認められた。前者に関しては、培養内皮細胞においてTGF β 1-Smadシグナル伝達系がC2 α に依存したことから、内皮細胞に対するTGF β 1作用がC2 α ヘテロKOマウスで障害されたことによる可能性が考えられる。一方、後者に関しては、TGF β 1は平滑筋/周皮細胞に作用して分化や細胞外基質産生を促進することから、壁細胞(平滑筋/周

皮細胞)に対する作用がC2 α ヘテロKOマウスで障害されたことによる可能性が考えられる。当研究室では血管平滑筋にC2 α タンパクが発現していることを観察している⁹⁾。この観察もこの可能性を支持する。第三に、C2 α ヘテロKOマウスにおける血管新生の障害はTGF β 1では認められたが、VEGFでは観察されず、血管新生因子特異的である可能性が示唆された。このことは、血管新生因子シグナリングにおけるC2 α の関与の分子機構を考える上で、重要である。

今後、本研究で見出した*in vitro*における内皮細胞におけるTGF β 1-Smadシグナル伝達系におよぼすC2 α 作用と*in vivo*の血管新生におけるC2 α 作用の関連をより深く解明するために、TGF β 1-Smadシグナル伝達系により誘導される細胞増殖、細胞遊走、管腔形成といった内皮細胞機能におよぼすC2 α ノックダウンの影響を検討する必要がある。また、マウス個体において、内皮細胞、平滑筋いずれのC2 α が血管新生の各段階において必須の役割を果たすかを*in vivo*で明らかにするために、当研究室で作製した以下の2系統のC2 α Conditional KO (CKO)マウス、すなわち血管内皮特異的C2 α CKOマウス(C2 α -eCKO)と平滑筋特異的C2 α CKOマウス(C2 α -smCKO)を用いて、TGF β 1による*in vivo*血管新生の異常の有無を解析する計画である。

結 語

本研究により、C2 α は血管内皮細胞におけるTGF β 1-Smad2/3シグナル伝達経路に必須であり、*in vivo*でのTGF β 1により誘導される血管新生にも必要であった。

参 考 文 献

- 1) Cantley, LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002; 296: 1655-1657
- 2) Sakurada, S., Takuwa, N., Sugimoto, N., Wang, Y., Seto, M., Sasaki, Y., Takuwa, Y. Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ. Res.* 2003; 93: 548-556
- 3) Yoshioka K, Sugimoto N, Takuwa N, Takuwa Y. Essential role for class II phosphoinositide 3-kinase α -isoform in Ca²⁺-induced, Rho- and Rho kinase-dependent regulation of myosin phosphatase and contraction in isolated vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 2007; 71: 912-920
- 4) Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*. 2003; 425: 577-584
- 5) Wang Y, Yoshioka K, Azam MA, Takuwa N, Sakurada S, Kayaba Y, Sugimoto N, Inoki I, Kimura T, Kuwaki T, Takuwa Y. Class II phosphoinositide 3-kinase α -isoform regulates Rho, myosin phosphatase and contraction in vascular smooth muscle. *Biochem. J.* 2006; 394: 581-592



Profile

2008年3月	神奈川工科大学工学部 応用化学科 卒業
2009年4月	金沢大学大学院医学系 研究科修士課程 修了
同年10月～	金沢大学大学院医学系 研究科博士課程 在籍中